

針対針電極における酵母プロトプラストの捕獲

栗延俊太郎* ・ 岩部 睦**

Collection of Yeast Protoplasts on pin-pin Electrode

Shuntaro KURINOBU and Atsushi IWABU

ABSTRACT

The pearl chain formation of cells using dielectrophoresis is required in advance of cell fusion. In this study, the yeast protoplasts are suspended in a chamber that electrodes of pin-pin configuration are mounted. The process of pearl chain formation of protoplasts that are collected on electrodes, is clarified experimentally. Also, the dependence of the number of collected protoplasts on frequency is measured as functions of applied voltage, a distance between pins of electrode and a conductivity of suspending medium.

The low conductivity of suspension is found to be suitable for a collection. The collection of protoplasts is caused above 100 kHz and below 700 Hz at a conductivity of 4 μ S. The spectrum of the number of collected protoplasts shows a peak at about 5 MHz at the same conductivity. Also, it is found from the observation that the number of collected cells with cell walls is considerably larger than that of collected protoplasts.

キーワード：プロトプラスト、酵母、誘電泳導

Key Words : Protoplast, Yeast, Dielectrophoresis

1. まえがき

バイオテクノロジーの中で、細胞融合や細胞に穿孔を行い遺伝子などを注入する技術は重要であり、これを電気パルスで行う方法が広く利用されるようになった。⁽¹⁾ 電気パルスで細胞融合させる場合、誘電泳動によるパールチェーン形成で細胞同士を結合させる必要があり、ポリエチレングリコールにより細胞融合させる場合も、同様の方法が細胞融合の成功の割合を増加させるのに有効であることが報告されている。⁽²⁾⁽³⁾ 細胞と細胞の結合状態が細胞融合に与える影響は大きく、細胞の誘電泳導の特性を明かにすることが重要である。

また近年誘電泳動を用いた細胞の操作が微細加工技術の進展に伴い発展してきており、それに関する理論的及

び実験的研究がいくつか報告されている。誘電泳導により、細胞を装置内の適当なところへ移動させたり、細胞を分離する装置の研究も行なわれている。⁽⁴⁾⁽⁵⁾⁽⁶⁾

以上のように、誘電泳動は細胞の操作に広く用いられており、誘電泳動における細胞の特性を明かにする必要がある。細胞の誘電泳導については今までに多くの報告があるが、実用上重要なプロトプラストについては余り調べられていない。

本研究では、針対針電極を用いて不平等電界を形成し、誘電泳動により電極に捕獲された細胞が数珠玉を形成する過程を調べると共に、電極に捕獲される細胞数を条件を変えて測定し、最大の捕獲数になる条件を調べた。周波数特性についても、理論的に検討を行なった。また比

*電子・電気工学科

**三菱電気エンジニアリング

較のためプロトプラストにしてい細胞についても細胞の捕獲状態を調べた。なお実験にはパン酵母の *Saccharomyces cerevisiae* のプロトプラストを使用した。

2. 実験方法

実験試料としてパン酵母 *Saccharomyces cerevisiae* のプロトプラストを使用したのは、パン酵母が実用上重要であると共に簡単に培養ができ、その電気的特性がよく研究されているためである。最初に、酵母の培養方法とプロトプラストの作製方法について、簡単に述べる。酵母は Yeast Extract 1%, Pepton 2%, Glucose 2% の溶液を培地として 26℃ の恒温で 1 日培養する。培養した細胞を 0.1M の EDTA-2Na、1% の 2-メルカプトエタノールで順に洗浄し、1M のソルビトール中でザイモリエイス 20T により pH7.5、35℃ で 1 時間恒温槽で処理しプロトプラストにする。pH の調整はリン酸バッファを用いる。その後プロトプラストにした細胞を 1M のソルビトールで洗浄し、同じ組成の溶液に懸濁して実験に用いる。

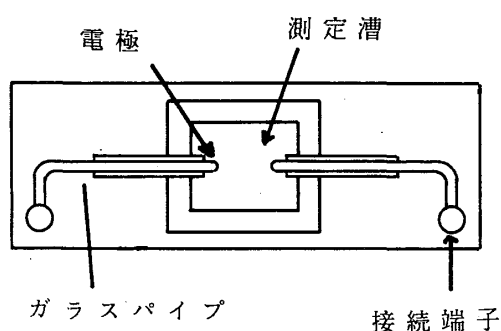


図1 針対針電極と容器

Fig.1 A schematic diagram of electrodes of pin-pin configuration in a chamber

誘電泳動の実験に用いた測定用容器を図1に示す。スライドガラス上にガラス製の測定槽を固定する。次に先端を半球上に加工した直径0.1mmの白金線を、先端部分が少し出るようにしてガラス細管に通し、このガラス細管を予め刻んであった測定槽の溝に対向させて取り付ける。このようにして作製した測定用容器の測定槽にプロトプラストを懸濁させた液を入れ、針対針電極に正弦波を印加し、そのとき針に捕獲される細胞の様子を顕微鏡で観察するとともに写真撮影した。これらの実験を印加電圧 v 、周波数 f 、電極間距離 d 、溶液の導電率 σ を変えて行なった。また細胞膜の影響を調べるためプロトプラストにしてい細胞についても同様な実験を行なった。細胞の密度は、トーマ血球盤を用いて計測し、

約 $10^6/\text{cm}^3$ に調整した。懸濁液の導電率を変えるために塩化カルシウムを使用した。

3. 実験結果

図2に電極に捕獲されたプロトプラストの写真の一例を示す。プロトプラストは数珠玉状につながっていることが写真からわかる。

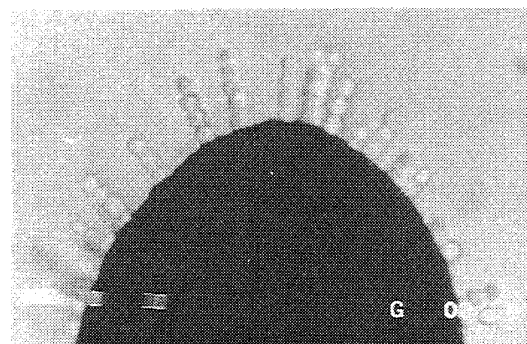


図2 電極の先端に捕獲されたプロトプラスト

Fig.2 Collected protoplasts at pin top of an electrode

観察からプロトプラストの捕獲過程は、次のようになることがわかった。電圧を印加すると、すぐに電極近傍にいたプロトプラストが、電極に誘電泳導により捕獲される。次に少し離れた所にいたプロトプラストが電極の誘電泳導力により電極近傍に来る。しかし電極近傍のある場所から、電極に捕獲されていたプロトプラストによる誘電泳導力が、電極そのものの誘電泳導力より大きくなるので、その場所から急に方向を変え、電極に捕獲されずに、すでに電極に捕獲されているプロトプラストの先端に捕獲される。このような過程が繰り返されてプロトプラストの数珠玉が形成される。

図3は捕獲数の時間変化を示してあり、導電率は $4 \mu\text{S}/\text{cm}$ の場合である。横軸は電圧印加後の時間 t で、電極間距離 d は 0.5mm である。縦軸の捕獲数は、図2の写真で観察されるプロトプラストのすべての個数です。なぜならプロトプラストの捕獲状態や捕獲過程に関わらず、捕獲数は誘電泳導力で電極に捕獲されたプロトプラストの総数を示しているからである。電圧印加後60秒後では周波数の変化に対する捕獲数の差がはっきりしてくるので、以下の図では60秒後の捕獲数を結果として用いた。

図4は懸濁液の導電率を変えたときの、周波数とプロトプラストの捕獲数を示した図である。×印が $\sigma = 0.4 \text{ mS}/\text{cm}$ 、○印が $\sigma = 4 \mu\text{S}/\text{cm}$ の時であり、印加電圧 v は 11V、電圧印加後の時間 t は 60秒、電極間距離 d は

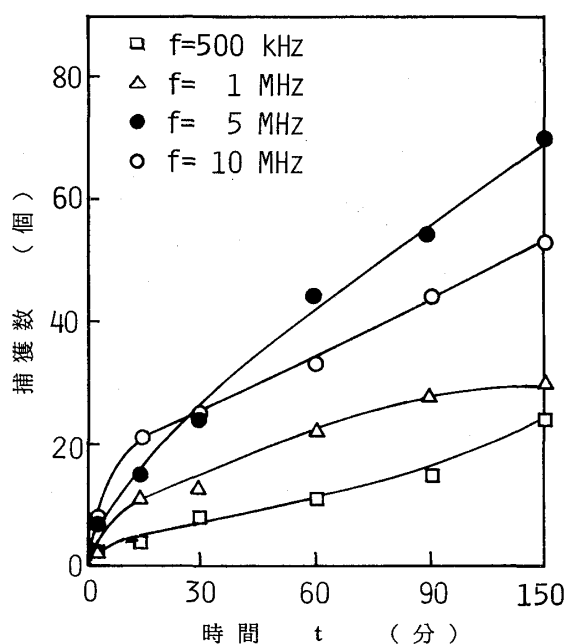


図3 時間を変えた場合の捕獲数と周波数 f の関係

Fig.3 The number of collected protoplasts vs. time t as a function of frequency

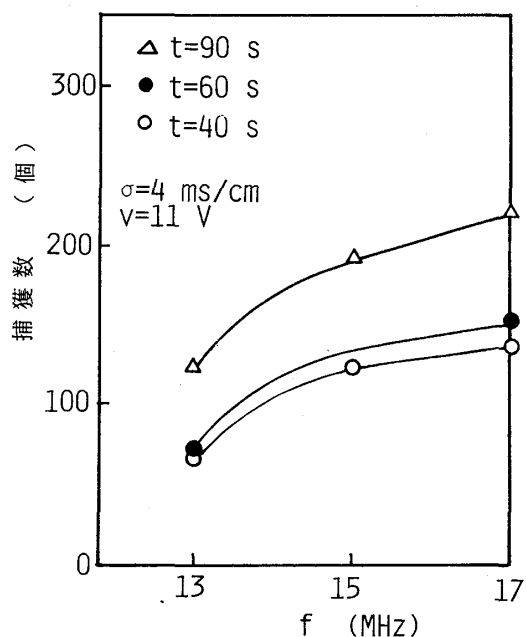


図4 導電率 σ を変えた場合の捕獲数と周波数 f の関係

Fig.4 The number of collected protoplasts vs. frequency as a function of conductivity of suspension

0.5mmの場合である。どちらの特性も100kHzより高い周波数で捕獲が始まり、約5MHzの周波数で最大となることがわかる。ただ導電率の低い場合は700Hzより低い周波数で捕獲が見られるが導電率の高い場合は捕獲が見られない。これは導電率の高い場合、500Hz以下で気泡の発生が観察されており、これがその要因だと考えられる。また低周波域では細胞が電極に捕獲されたり離れたりする様子が観察されたが、高周波では一度捕獲された細胞は、電圧の印加を止めるまで電極から離れないことも観察された。なお図4の導電率を変えた実験で、使用した測定槽の大きさが異なるので導電率と捕獲数そのものの関係については比較せず、それぞれの周波数依存性のみを取り上げた。

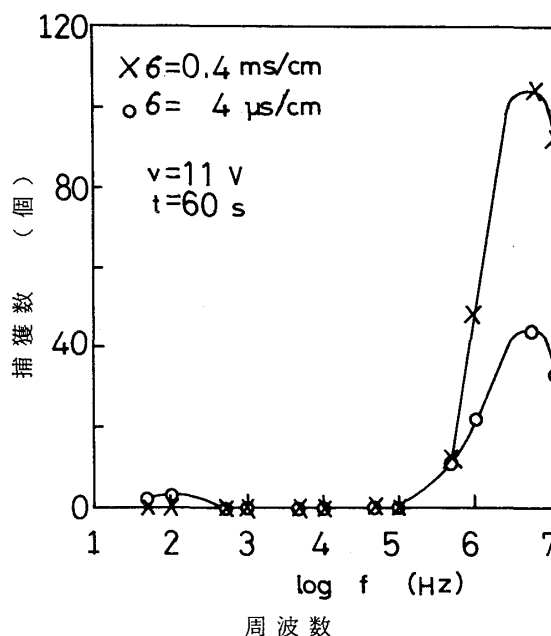


図5 導電率 σ を変えた場合の捕獲数と周波数 f の関係 (導電率が4 mS/cmの場合)

Fig.5 The number of collected protoplasts vs. frequency as a function of conductivity of suspension ($\sigma=4$ mS/cm)

次に懸濁液の導電率を4 mS/cmにした場合の実験結果を図5に示す。この実験では周波数が13MHz以上の結果が示されているが、これは13MHz未満の周波数では気泡が発生し測定が不可能なためである。このように導電率を大きくすると図4と異なり、かなり高い周波数にしないと捕獲が始まらず、このような導電率の溶液は実用的でない。

図6は印加電圧と捕獲数の関係を示している。図より捕獲数は18V付近で、最もよく捕獲されていることがわかる。またそれ以上の電圧では捕獲数が減少しているが、これは電極のまわりで溶液の流れに乱れが生じているのが観察されていて、このためだと考えられる。

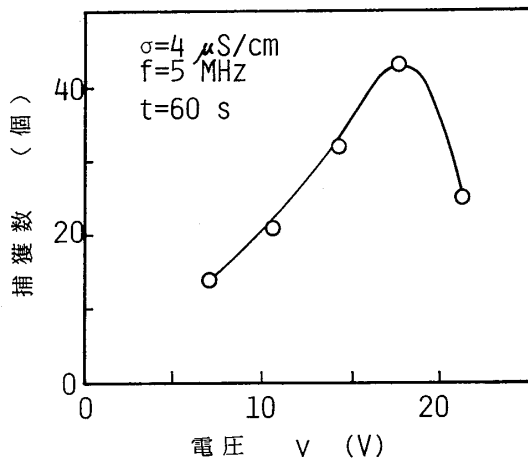


図6 捕獲数と電圧の関係

Fig.6 The number of collected protoplasts vs. voltage at a conductivity of $4 \mu\text{S}$.

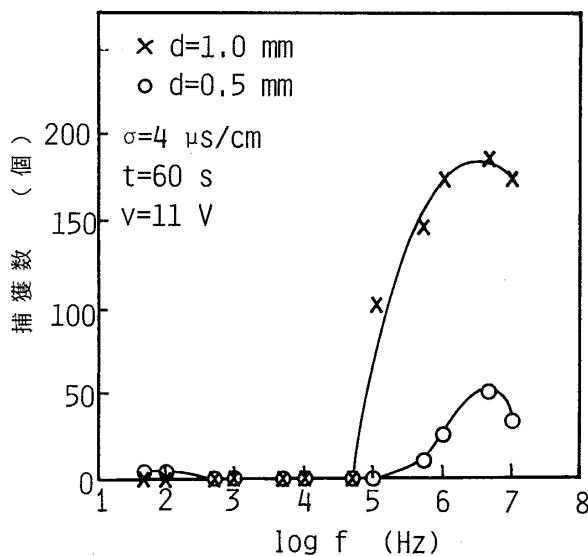


図7 電極間距離 d を変えた場合の捕獲数と周波数 f の関係

Fig.7 The number of collected protoplasts vs. frequency as a function of a distance between electrodes.

電極間距離 d を変えた時の周波数と捕獲数の関係を示したのが図7である。○印が電極間距離が0.5mm、×印が電極間距離が1.0mmの結果で、共に電圧印加後の時間 t は60 s の場合である。この場合も、測定槽の大きさが異なるので周波数特性のみ比較した。電極間距離が1.0mmの場合は、70kHzより高い周波数で捕獲が見られ、電極間距離が0.5mmの場合は100kHzより高い周波数と700Hzより低い周波数で捕獲されている。しかし、捕獲のピークは両方とも5 MHzである。1.0mmの場合500Hz以下の周波数ではプロトプラストが電極に近づく

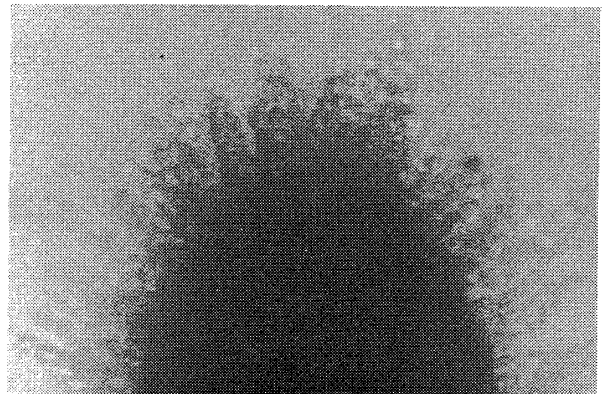


図8 電極の先端に捕獲された細胞壁を持った細胞

Fig.8 Collected cells with cell walls at pin top of a electrodes.

ように動いていることが観察されたが、これが捕獲されないのは電極間距離が広く、電界が弱いためと考えられる。

次に図8はプロトプラストにしていな細胞膜を持った細胞が、電極に捕獲されている写真の例である。プロトプラストにしていな場合は、プロトプラストの場合の図2に比べて、捕獲状態に違いが見られる。図2のプロトプラストの方は数珠玉状に捕獲されており、電極表面付近でもプロトプラストは積層していないが、プロトプラストにしていな細胞の場合は電極付近では細胞が積層していることがわかる。しかし、捕獲過程の観察から、プロトプラストにしていな場合は数珠玉状に一度細胞が捕獲され、その後電極の電界による力で折れ曲がり、これが繰り返されることにより積層することになった。従ってその捕獲に到るまでの過程は、両者とも同じである。しかし捕獲されている細胞の絶対数はプロトプラストにしていな細胞ははるかに多く、細胞壁の効果が、細胞の捕獲に非常に大きいことがわかる。細胞壁は従来懸濁液に近い性質を持っていると仮定されていたが、実験の結果からかなり低い導電率を有すると思われるのでさらに詳しい研究が必要と思われる⁽⁶⁾。

4. 溶液の誘電率

誘電泳動によって捕獲されるプロトプラストの周波数特性を理論的に検討するために、実験に用いた1 Mのソルビトール溶液の誘電率の周波数依存性を測定した。また比較のため純水の特性も測定した。図9はその結果を示したもので、横軸は周波数、縦軸は比誘電率を示している。ソルビトール溶液の導電率は $4 \mu\text{S}/\text{cm}$ で、純水の導電率は $0.8 \mu\text{S}/\text{cm}$ ある。細胞の捕獲が問題となる10kHz以上の周波数では、共に水の比誘電率である約80となっており、ソルビトール溶液は純水と同じ特性を示

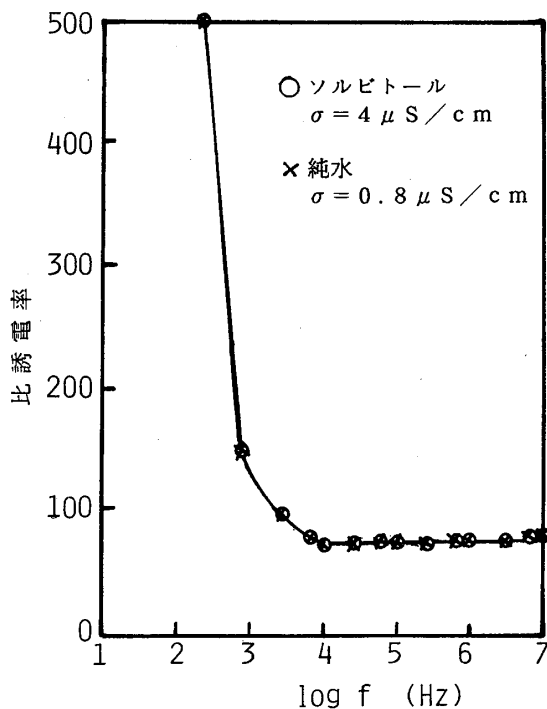


図9 比誘電率と周波数 f の関係

Fig.9 Frequency dependence of relative dielectric constant.

すことがわかった。

5. 考察

本研究では細胞懸濁液中に正弦波の電界を印加した場合のプロトプラストの誘電泳導による捕獲について調べた。気泡の発生のない導電率の高い場合が実用的に重要と思われるので、 $4 \mu\text{S}/\text{cm}$ の場合について、周波数特性について検討した。

細胞を半径 a の球形と仮定し、細胞は十分小さく細胞付近の電界 E は一定であるとする、溶液中の細胞に電界が及ぼす力 \vec{F} は、次式で与えられる⁽⁹⁾。

$$\vec{F} = 2\pi a^3 \text{Re} \left[K_1 \frac{K_2 - K_1}{K_2 + 2K_1} \right] \nabla |\vec{E}|^2 \quad (1)$$

ここで K_1 は溶液の誘電係数であり、 K_2 は細胞の誘電係数である。 K_i は i における誘電係数で、次式で与えられる。

$$K_i = \epsilon_i - i \sigma_i / \omega \quad (2)$$

ϵ_i 及び σ_i はそれぞれ誘電率と導電率である。また Re は実数部を示す。

F が正の場合に細胞が捕獲されるが、図9の溶液の誘電率の測定でわかるように、 10kHz 以上では誘電率は一定であり、また導電率も当然一定と考えられるので、特に K_2 が細胞の捕獲に大きな影響を持つものと思われる。電気的には、プロトプラストは細胞膜とその内部で大き

くその特性が異なっており、細胞膜内部は導電率が低く高周波でその特性が余り変化しないと思われるので、細胞膜の効果が誘電泳導力に大きな影響を持つものと考えられる。

また文献(7)にプロトプラストにしてない酵母細胞の場合、約 $4 \mu\text{S}/\text{cm}$ の導電率では 1MHz 付近に捕獲の最大値があることが示されており、細胞壁があっても最大になる周波数が異なるものの同じような特性になっている。しかし図2と図8に示された捕獲状態の違いから明かなように、細胞壁の有無により誘電泳動力には大きな違いがあり、細胞壁の効果を詳しく調べる必要があると思われる。

6. まとめ

本研究では、プロトプラスト懸濁液中の針対針電極に正弦波の電圧を印加し、プロトプラストの数珠玉が形成される過程と捕獲のための最適条件について調べた。得られた結果を下記に示す。

(1) プロトプラストの数珠玉が形成される過程は、次のようになることがわかった。最初電極の電界によりプロトプラストは電極に引き寄せられるが、電極近傍では電極に捕獲されているプロトプラストによる誘電泳導力が大きいので、電極に捕獲されているプロトプラストに、次にきたプロトプラストが捕獲され、これが繰り返されて数珠玉が形成される。

(2) 条件を変えて、捕獲されるプロトプラストの数を測定した結果、次のような結果が得られた。

溶液の導電率が低いと気泡の発生が見られることから、捕獲のためには導電率は低い方がよい。 100kHz より高い帯域及び 700Hz 以下の帯域で、プロトプラストが捕獲される。捕獲数が最大になる周波数は約 5MHz であり、また捕獲数が最大になる電圧があることが明らかになった。

(3) プロトプラストにしていな細胞の誘電泳動力は、プロトプラストの誘電泳導力よりはるかに大きいことがわかった。

本研究を進めるにあたり、試料を提供して下さい、有益なご助言を頂きました福山大学工学部の壺井基夫助教授に深く感謝します。

参考文献

- (1) U. Zimmermann and W.M. Arnold: "Biophysics of Electroinjection and Electrofusio", J. Electrostatics, Vol.21, p.309 (1988).
- (2) 鷲津正夫: 「電界による細胞操作」, 静電気学会誌, 10巻, 3号, p.150 (1986).

- (3) 軽部征夫, 民谷栄一: 「電気パルスによる細胞操作」 静電気学会誌, 10巻, 3号, p.157 (1986).
- (4) 長谷川勝二, 日比忠明: 「静電界による細胞融合・遺伝子導入技術」, 静電気学会誌, 12巻, 5号, p.347 (1988).
- (5) M.Wasizu, T.Nanba and S.Masuda: "Handling of Biological Cells Using Fluid Integrated Circuit", Conference Record of IEEE/IAS' 88 (Pittsburgh, Pennsylvania) p.1735 (1988).
- (6) 増田閃一, 鷺津正夫: 「電界による細胞操作」, 応用物理, 58巻, p.383 (1989).
- (7) H.P.Pohl: "Dielectrophoresis", Cambridge University Press, Cambridge (1978).
- (8) K.Asami: "Dielectric Properties of Protoplasm Plasma Membrane and Cell Wall in Yeast Cells", Bull.Inst. Chem. Res. Kyoto Univ., Vol.55, p.394 (1977).
- (9) T.B.Jones and G.A.Kallio: "Dielectrophoretic Levitation of Spheres and Shells", J. Electrostatics, Vol.6, p.207 (1979).